

**This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- **BLACK BORDERS**
- **TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- **FADED TEXT**
- **ILLEGIBLE TEXT**
- **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- **COLORLED PHOTOS**
- **BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS**
- **GRAY SCALE DOCUMENTS**

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
Please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

51

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

Int. Cl.:

C 07 c, 103/52

A 61 k, 27/00

DEUTSCHES PATENTAMT



52

Deutsche Kl.:

12 q, 6/01

30 h, 2/36

10

11

21

22

43

Offenlegungsschrift 2 357 334

Aktenzeichen: P 23 57 334.4

Anmeldetag: 16. November 1973

Offenlegungstag: 6. Juni 1974

Ausstellungspriorität: —

30

Unionspriorität

32

Datum: 24. November 1972

33

Land: Schweiz

31

Aktenzeichen: 17184-72

54

Bezeichnung: Peptide

61

Zusatz zu: —

62

Ausscheidung aus: —

71

Anmelder: F. Hoffmann-La Roche & Co. AG, Basel (Schweiz)

Vertreter gem. § 16 PatG: Werth, A. van der, Dr.-Ing.; Lederer, F., Dipl.-Chem. Dr.;
Pat.-Anwälte, 2000 Hamburg und 8000 München

72

Als Erfinder benannt: Gillessen, Dieter, Dr., Birsfelden; Rudinger, Josef, Prof. Dr., Zürich;
Studer, Rolf, Dr., Bottmingen (Schweiz)

DT 2 357 334

16. Nov. 1973

Dr. Ing. A. van der Werff
Dr. Franz Lederer
PATENTANWÄLTE

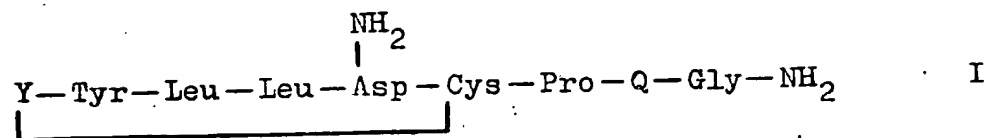
2357334

RAN 4105/9

F. Hoffmann-La Roche & Co. Aktiengesellschaft, Basel/Schweiz

P E P T I D E

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Polypeptide
der Formel



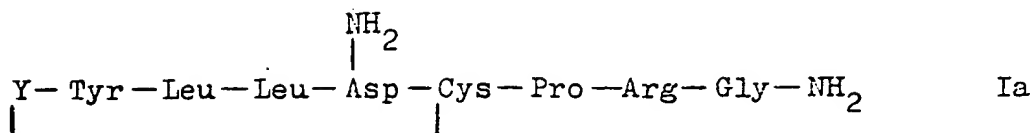
worin Q den Rest des Arginins oder Lysins und
Y den Rest des Cysteins, der β -Mercapto-
propionsäure (Mpr) oder Gly-Cys- dar-
stellen und alle Aminosäuren mit einem
Asymmetriezentrum L-Konfiguration auf-
weisen,

und deren pharmazeutisch anwendbare, nicht-toxische Säure-
additionssalze, sowie Verfahren zur Herstellung dieser Ver-
bindungen.

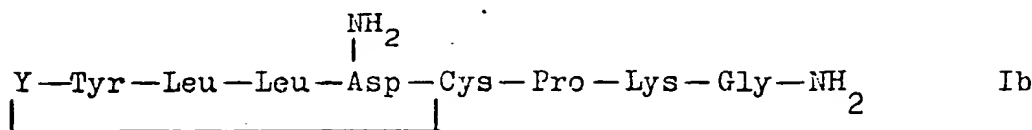
409823/1105

2357334

Bei den unter der Formel I zusammengefassten Verbindungen der Formeln

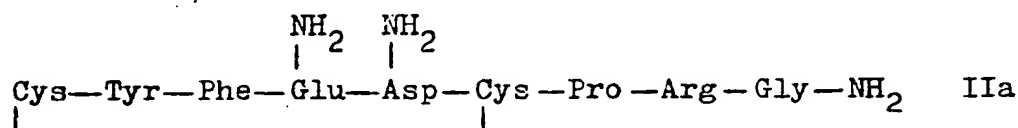


und

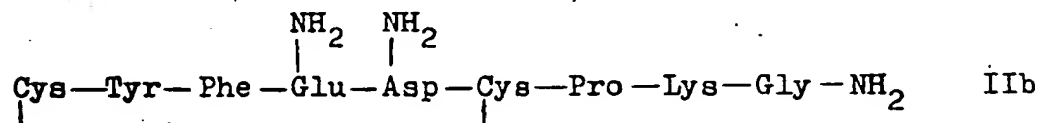


in denen Y die oben angegebenen Bedeutungen hat,

handelt es sich um Analoge und deren Derivate der in der Natur vorkommenden Neurohypophysen-Hormone, z.B. des Arginin- bzw. Lysin-Vasopressins, der Formeln

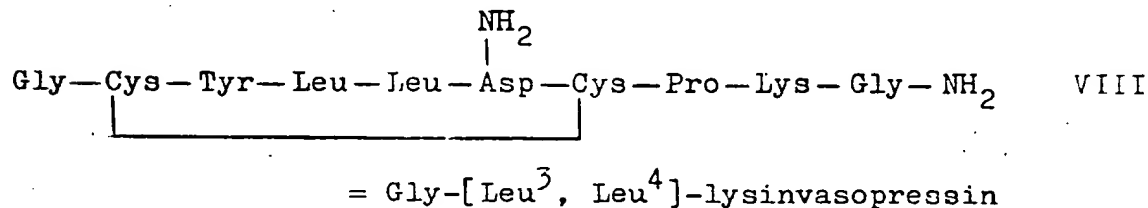
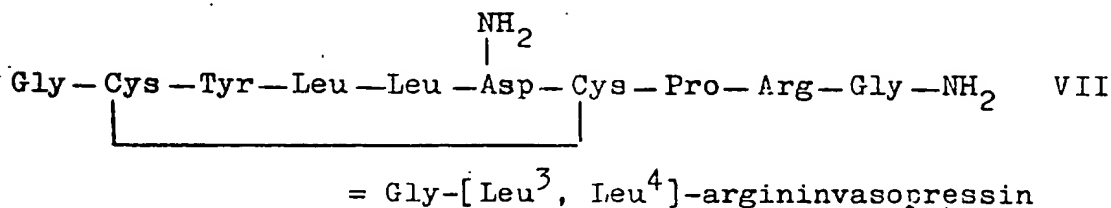
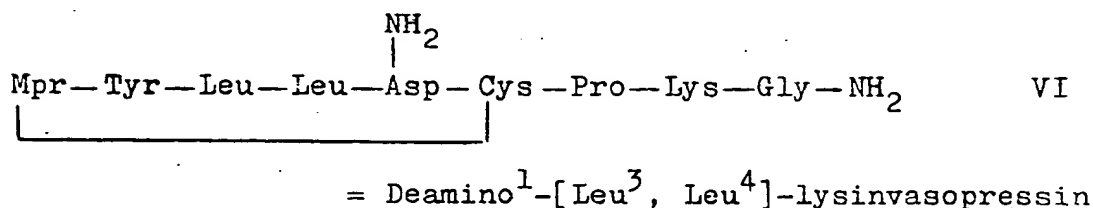
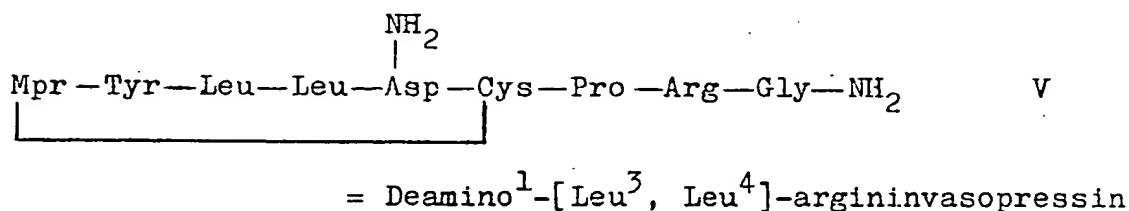
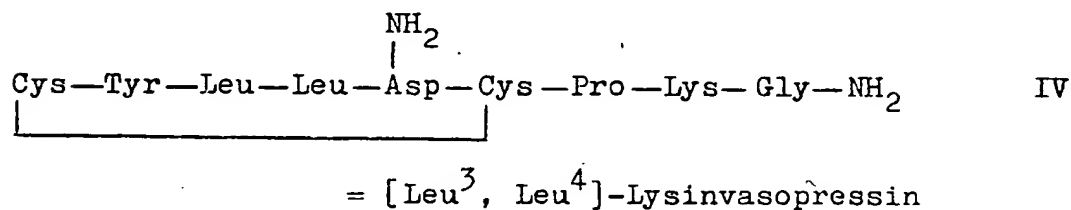
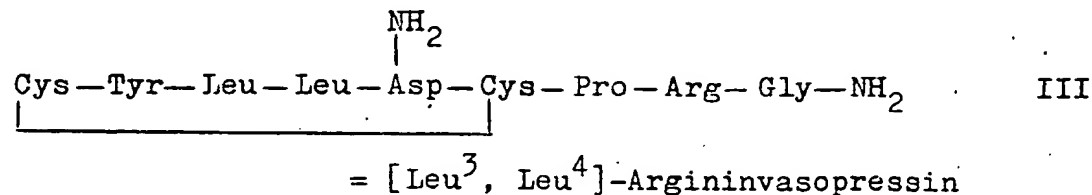


und



Gegenüber den in der Natur vorkommenden Vasopressinen unterscheiden sich die erfindungsgemässen Verbindungen durch den Ersatz der Aminosäure Phenylalanin durch Leucin, der Aminosäure Glutamin durch Leucin und ggf. der Aminosäure Cystein durch β -Mercaptopropionsäure oder das Dipeptid Glycylcystein.

Bei den unter der allgemeinen Formel I zusammen-
gefassten Verbindungen handelt es sich im einzelnen um die
folgenden Polypeptide:



Die in der vorliegenden Patentanmeldung verwendeten Abkürzungen für die einzelnen Aminosäuren und ihre Schutzgruppen sind die in der Peptidchemie bisher gebräuchlichen und dem Fachmann allgemein bekannten [Literatur: Schröder, E. und Lübke, K.,: The Peptides, Academic Press, New York & London, Bd. I (1965) und Bd. II (1966) und IUPAC-IUB-Regeln]; sie bedürfen daher hier keiner weiteren Definition.

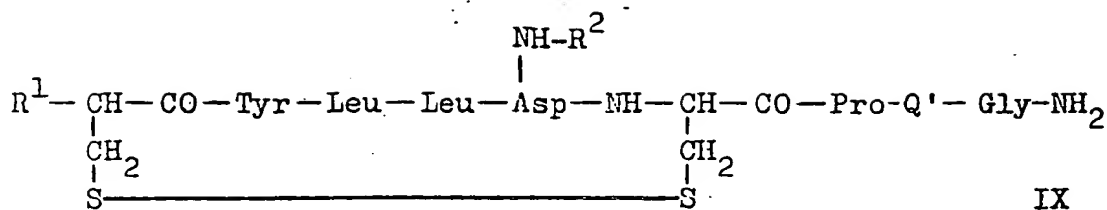
Im übrigen wird die β -Mercaptopropionsäure, die sich vom Cystein ableitet, in der vorliegenden Anmeldung ebenfalls als "Aminosäure" betrachtet, sodass beispielsweise von β -Mercaptopropionyl-tyrosin als von einem Dipeptid usw. die Rede ist.

Sofern nicht ausdrücklich anders vermerkt, handelt es sich bei den Aminosäuren mit einem Asymmetriezentrum stets um die L-Konfiguration.

Beispiele pharmazeutisch anwendbarer, nicht-toxischer Säureadditionssalze sind Salze mit anorganischen Säuren wie Salzsäure, Bromwasserstoff, Phosphorsäure, Schwefelsäure und Perchlorsäure oder mit organischen Säuren wie Essig-, Oxal-, Malein-, Äpfel-, Wein- oder Citronensäure.

Die neuen Polypeptide der Formel I und ihre Säureadditionssalze können in an sich bekannter Weise hergestellt werden, insbesondere dadurch, dass man

a) von einem Peptid der Formel



worin R^1 Wasserstoff oder einen Rest $R^{11}-NH-$,
 R^{11} Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe oder den
ggf. geschützten Glycylrest,
 R^2 Wasserstoff oder eine Amidschutzgruppe,
 Q' einen Rest der Formel

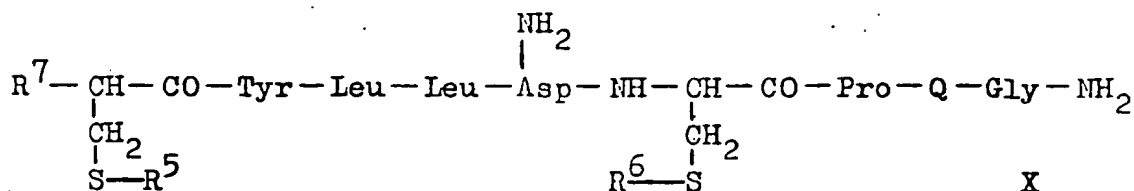
$$-NH-CH[-(CH_2)_3-NH-C(=NH)-NHR^3]-CO- \quad \text{oder}$$

$$-NH-CH[-(CH_2)_4-NH-R^4]-CO-,$$

R^3 Wasserstoff oder eine den Guanidinrest
schützende Gruppe und
 R^4 Wasserstoff oder eine die α -Aminogruppe
des Lysins schützende Gruppe bedeuten, aber
mindestens einer der Reste R^1 , R^2 und R^3 bzw.
 R^4 eine Schutzgruppe darstellt bzw. enthält
und alle Aminosäuren mit einem Asymmetrie-
zentrum L-Konfiguration aufweisen,

die Schutzgruppe(n) abspaltet und das freie Peptid gegebenenfalls durch Umsetzung mit einer organischen oder anorganischen Säure in ein pharmazeutisch anwendbares, nicht-toxisches Säureadditionssalz überführt, oder

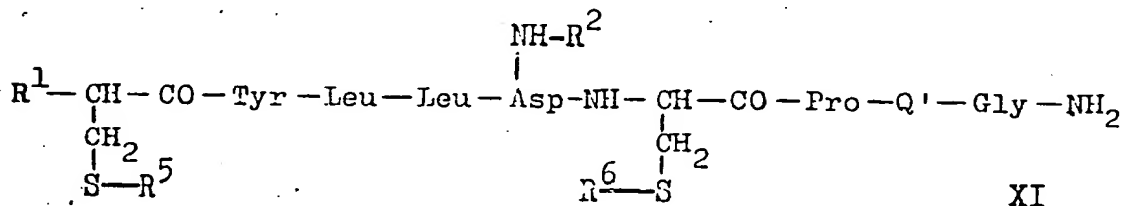
b) ein Peptid der Formel



worin Q die oben angegebenen Bedeutungen hat,
 R^5 und R^6 jeweils Wasserstoff oder Sulfhydryl-
 schutzgruppen darstellen und
 R^7 Wasserstoff, H_2N - oder $Gly-NH$ - ist und
 alle Aminosäuren mit einem Asymmetrie-
 zentrum L-Konfiguration aufweisen,

oxydiert, unter gleichzeitiger oder vorgängiger Abspaltung
 gegebenenfalls vorhandener Schutzgruppen und das Reaktions-
 produkt gewünschtenfalls durch Umsetzung mit einer organischen
 oder anorganischen Säure in ein pharmazeutisch anwendbares,
 nicht-toxisches Säureadditionssalz überführt, oder

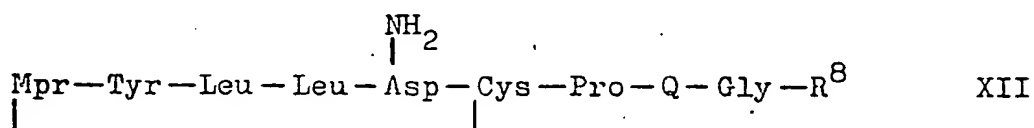
c) ein Peptid der Formel



worin R^1 Wasserstoff oder $R^{11}-NH$ -,
 R^{11} Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe oder den
 gegebenenfalls geschützten Glycylrest,
 R^2 Wasserstoff oder eine Amidschutzgruppe,
 Q' einen Rest der Formel
 $-NH-CH[-(CH_2)_3-NH-C(=NH)-NHR^3]-CO-$ oder
 $-NH-CH[-(CH_2)_4-NH-R^4]-CO-$,
 R^3 Wasserstoff oder eine den Guanidinrest
 schützende Gruppe;
 R^4 Wasserstoff oder eine die ϵ -Aminogruppe des
 Lysins schützende Gruppe und
 R^5 und R^6 jeweils Wasserstoff oder Sulfhydryl-
 schutzgruppen darstellen, aber mindestens
 einer der Reste R^1 , R^2 und R^3 bzw. R^4
 eine Schutzgruppe darstellt bzw. enthält
 und alle Aminosäuren mit einem Asymmetrie-

zentrum L-Konfiguration aufweisen,
unter gleichzeitiger Abspaltung der Schutzgruppe(n) oxydiert
und das Reaktionsprodukt gewünschtenfalls durch Umsetzung mit
einer organischen oder anorganischen Säure in ein pharma-
zeutisch anwendbares, nicht-toxisches Säureadditionssalz über-
führt, oder

d) eine Verbindung der Formel

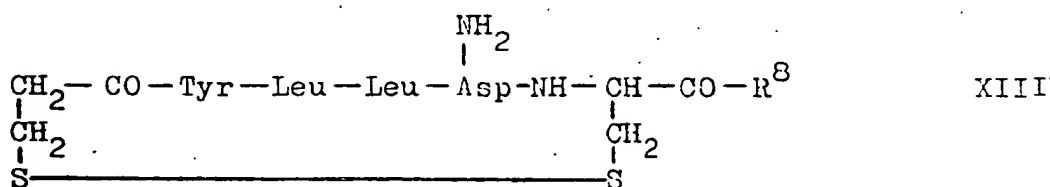


worin Q die oben angegebenen Bedeutungen hat,

R^8 Hydroxy oder ein die Carboxylgruppe
aktivierender Rest ist und

Mpr den Rest der β -Mercaptopropionsäure bedeutet,
amidiert oder

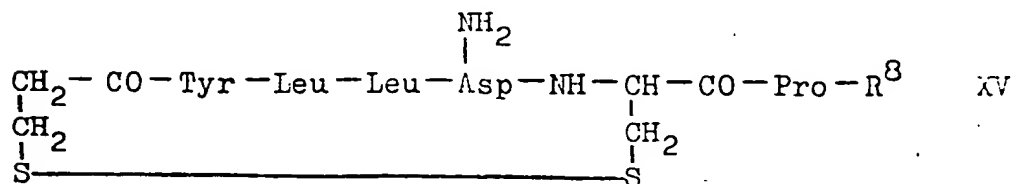
e) ein Hexapeptid der Formel



mit einem Tripeptid der Formel

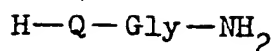


bzw. ein Heptapeptid der Formel



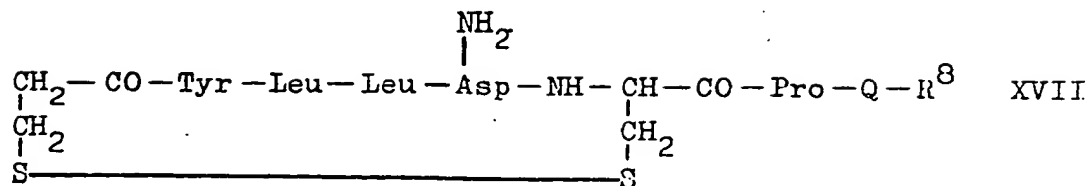
mit einem Dipeptid der Formel

409823/1105



XVI

bzw. ein Octapeptid der Formel



mit Glycinamid umgesetzt und das erhaltene Nonapeptid gegebenenfalls in ein pharmazeutisch anwendbares, nicht-toxisches Säureadditionssalz überführt, wobei in den Formeln XIV und XVI Q die oben angegebenen Bedeutungen hat, R^8 Hydroxy oder eine die Carboxylgruppe aktivierende Gruppe darstellt, und alle Aminosäuren mit einem Asymmetriezentrum L-Konfiguration aufweisen.

Die Oxydation einer Verbindung der Formeln X oder XI kann in bekannter Weise erfolgen (siehe z.B. Schröder-Lübke, Bd. I, Seite 275 ff), vorzugsweise in wässriger oder wässrig-organischer Lösung durch Einleiten von Luft oder Sauerstoff oder mittels Wasserstoffperoxid, Jod, 1,2-Dijodäthan oder Kaliumferricyanid. Allfällig vorhandene Sulfhydrylschutzgruppen können vorgängig der Oxydation oder simultan entfernt werden. Eine Verbindung der Formel X mit $\text{R}^5 = \text{R}^6 = \text{Wasserstoff}$, Trityl, Benzhydryl, Acetamidomethyl, Benzylthiomethyl und Isobutyloxymethyl kann beispielsweise mit Dirhodan $((\text{SCN})_2)$ zum cyclischen Peptid oxydiert werden, eine Verbindung der Formel X mit $\text{R}^5 = \text{R}^6 = \text{Wasserstoff}$, Trityl oder Acetamidomethyl beispielsweise mit Jod.

Die Abspaltung von Schutzgruppen aus einem Peptid der Formeln IX oder XI kann ebenfalls in allgemein bekannter Weise und unter den für die einzelnen Gruppen geltenden Reaktionsbedingungen erfolgen.

409823/1105

Die Amidierung eines Peptids der Formel XII insbesondere eines solchen, in dem Q den Rest des Arginins darstellt, kann in an sich bekannter Weise erfolgen, vorzugsweise durch schonenden Umsatz des aktivierten Esters mit wässrigem Ammoniak bei Raumtemperatur.

Es können alle im Zusammenhang mit Peptidsynthesen bekannten Schutzgruppen verwendet werden.

Beispiele für Aminoschutzgruppen sind solche vom Acyl-Typ (wie Formyl, Benzoyl, Phthalyl, Trifluoracetyl, p-Tosyl, Aryl- und Alkylphosphoryl, Phenyl- und Benzylsulfonyl, Tritylsulfenyl, o-Nitrophenylsulfenyl, γ -Chlorbutyryl oder o-Nitrophenoxyacetyl), vom Alkyl-Typ (wie Trityl, Benzyl, Alkyliden) oder vom Urethan-Typ (wie Carbobenzoxo, p-Brom-, p-Chlor- oder p-Methoxycarbobenzoxo, Tolyloxy-, Allyloxy-, Cyclopentiloxy-, Cyclohexyloxy-, t-Butyloxy- oder 1,1-Dimethylpropyloxy-, 2-(p-Biphenyl)-2-propyloxy-carbonyl oder Benzylthiocarbonyl). Ferner können Aminogruppen durch Protonierung geschützt werden. Beispiele für Amidschutzgruppen sind Xanthenyl, 2,4-Dimethoxybenzyl, 2,4,6-Trimethoxybenzyl und 4,4'-Dimethoxybenzhydryl.

Als spezielle Schutzgruppen für den Argininrest seien beispielsweise genannt: p-Tosyl, Carbobenzoxo, p-Nitrocarbobenzoxo, t-Butoxy-, Adamantyloxy- oder Isobornyloxycarbonyl. Der Argininrest kann ferner durch Protonierung oder Nitrierung geschützt werden.

Beispiele für Sulfhydrylschutzgruppen sind Alkyl- oder Arylthiogruppen wie Aethylthio, t-Butylthio oder Phenylthio; Alkyl- und substituierte Alkylgruppen wie t-Butyl, 2-Diäthoxy-carbonyl-äthyl, Benzyl, Trityl, p-Methoxybenzyl, p-Nitrobenzyl, 4-Picolyl, Benzylthiomethyl, Acetamidomethyl oder Isobutyl-

oxymethyl; Acylgruppen wie Carbobenzoxo, Benzoyl, Acetyl, p-Methoxy-benzyloxy-carbonyl oder Aethylaminocarbonyl oder Tetrahydropyran-2-yl.

Die Ausgangsverbindungen der Formeln IX, X, XI, XII, XIII, XV und XVII sind neue Verbindungen und ebenfalls Gegenstand der Erfindung.

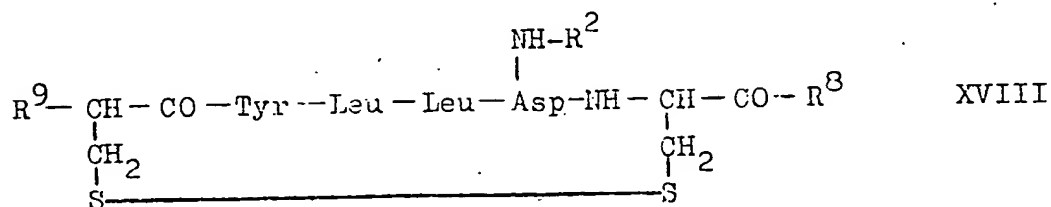
Die Herstellung der Ausgangsverbindungen kann in an sich bekannter Weise unter Verwendung der üblichen, insbesondere der obengenannten Schutzgruppen erfolgen.

Beispiele für Carboxylschutzgruppen sind O- und S-Ester (wie Methyl-, Aethyl-, t-Butyl-, Benzyl-, Cyanomethyl-, Phthalimidomethyl-, 4-Picolyl-, 2-p-Tosyläthyl-, Phenyl-, p-Nitrophenyl-, Thiophenyl- oder p-Nitrobenzylester), Amide oder Hydrazide (wie Trityl-, Phenyl-, Carbobenzoxo- oder t-Butoxycarbonylhydrazide). Ferner kann die Carboxylgruppe durch Salzbildung geschützt werden.

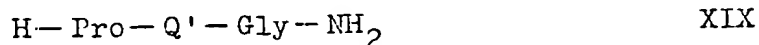
Beispiele für aktivierte Carboxylgruppen sind Ester wie Cyanomethyl-, p-Cyanophenyl-, p-Nitrophenyl-, 2,4,5-Trichlorphenyl-, Thiophenyl-, p-Nitrothiophenyl-, 1-Benzotriazolyl-, Phthalimidyl-, 1-Succinimidyl-, 1-Piperidyl-, 8-Chinolyl-, 5-Chlor-8-chinolyl-, 2-Pyridyl-, 2-Thiopyridylester oder Azide.

Eine Verbindung der Formel X oder XI kann beispielsweise durch sukzessive Kettenverlängerung eines Dipeptides um eine Aminosäureeinheit oder aus 2 oder mehreren Bruchstücken synthetisiert werden. Durch Oxydation in bekannter Weise kann eine Verbindung der Formel XI in

eine Verbindung der Formel IX überführt werden. Eine Ausgangs-
verbindung der Formel IX kann aber auch z.B. durch Umsetzung
einer Verbindung der Formel

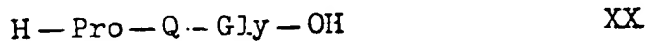


worin R^2 und R^8 die oben angegebenen Be-
deutungen haben und
 R^9 Wasserstoff, eine geschützte Amino-
gruppe oder den geschützten Glycyl-
aminorest darstellt,
mit einem Tripeptid der Formel



worin Q' die oben angegebene Bedeutung hat,
dargestellt werden.

Eine Verbindung der Formel XII kann beispielsweise
dadurch erhalten werden, dass man eine Verbindung XIII, in
der R^8 eine aktivierte Estergruppe darstellt, mit einem
Tripeptid der Formel



umsetzt und das Reaktionsprodukt gewünschtenfalls in an sich
bekannter Weise in einen aktivierten Ester überführt.

Eine Verbindung der Formel XVIII, in der R^9 Wasserstoff
ist, kann aber auch leicht durch Entfernung der Amidschutzgruppe
in ein Hexapeptid der Formel XIII überführt werden. Die

Heptapeptide XV und Octapeptide XVII können z.B. durch Umsetzung des Hexapeptides XIII mit einer Verbindung der Formel Pro-R^8 bzw. Pro-Q-R^8 erhalten werden.

Die Methode der Herstellung von Nonapeptiden der Formel I nach dem Prinzip 6+3, 7+2 oder 8+1 sowie durch Amidierung ist vorzugsweise für die Reihe der Arginin-vasopressin-Analogen geeignet.

Die erfindungsgemässen Verbindungen der Formel I haben hormonelle Aktivität, qualitativ ähnlich der der Neurohypophysen-Hormone. Speziell hervorzuheben ist die starke natriuretische Aktivität. Die erfindungsgemässen Verbindungen sind sowohl hinsichtlich der Wirkungsstärke als auch hinsichtlich der Wirkungsdauer natürlichem Argininvasotocin ($[\text{Ile}^3]$ -Argininvasopressin) und dem von V.J. Hruby et al. [J.Biol.Chem. 244, 3890 (1969)] hergestellten $[\text{Leu}^4]$ -Oxytocin, einem Neurohypophysen-Hormonanalogen, das die stärkste bisher bekannte natriuretische Aktivität aufweist, überlegen. Die blutdrucksteigernde Wirkung der erfindungsgemässen Verbindungen ist geringer als die von Argininvasotocin, so dass die natriuretische Aktivität der Verbindungen I gegenüber der blutdrucksteigernden Aktivität selektiv gesteigert ist.

Das $[\text{Leu}^3, \text{Leu}^4]$ -Argininvasopressin hat eine TRF_{Na} (Tubular Rejections Fraction des Na, nach Cort. et al. A.J. of Physiol. 215 (1968) 921) an der Katze von 6,9% bei 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und eine Halbwertszeit der Wirkungsdauer von 40 Minuten. Das Deamino¹- $[\text{Leu}^3, \text{Leu}^4]$ -argininvasopressin hat eine TRF_{Na} von 4,3% bei 20 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und eine Halbwertszeit der Wirkungsdauer von 45 Minuten. Das Gly- $[\text{Leu}^3, \text{Leu}^4]$ -argininvasopressin hat eine TRF_{Na} von 5,2% bei 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ und eine Halbwertszeit der Wirkungsdauer von 45 Minuten.

Aufgrund der angegebenen biologischen Aktivitäten eignen sich die Verbindungen zur Behandlung von Oedemen verschiedenster Art und allgemeinen Störungen des Elektrolytstoffwechsels, speziell solchen der Natriumretention.

Die Dosierung soll nach dem individuellen Bedarf geregelt werden und kann zwischen 100 µg bis 10 mg pro Einzeldosis, ein- bis mehrmals pro Tag verabreicht, variieren.

Die Monapeptide können in Form der freien Basen oder als Salze mit organischen oder anorganischen Säuren oder mit Säuregruppen enthaltenden Polymeren (wie z.B. Carboxymethylcellulose oder Tanninsäure) entweder alleine oder in Form von geeigneten medizinischen Zubereitungen für z.B. orale, parenterale, enterale oder intranasale Applikation verabreicht werden. Zur Herstellung medizinischer Zubereitungen können die Verbindungen mit anorganischen oder organischen Hilfsstoffen, die inert und physiologisch akzeptierbar sind, verarbeitet werden.

Beispiele für solche Hilfsstoffe sind:

für Tabletten: Lactose, Stärke, Talkum und Stearinsäure;

für Injektionslösungen: Wasser, Alkohole, Glycerin und Pflanzenöle;

für Suppositorien: Natürliche und gehärtete Öle und Wachse;

für intranasale Sprühlösungen: Wasser, Glycerin und andere flüssige Substanzen, die die Schleimhaut verträgt.

Die Zubereitungen können weiterhin beispielsweise geeignete Konservierungs-, Stabilisierungs- und Netzmittel sowie Süsstoffe, Farbstoffe und Geschmacksstoffe enthalten.

Die Erfindung wird durch die folgenden Beispiele illustriert. Die Temperaturen sind in Grad Celsius angegeben.

409823/1105

Beispiel 1

- (a) Z-L-Leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid.

18,0 g Z-L-Asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid [hergestellt nach R.L. Huguenin und R.A. Boissonnas, Helv. 49, 695 (1966)] wurden in 100 ml Eisessig gelöst und mit 100 ml einer 5 N HBr/Eisessig-Lösung versetzt. Das Gemisch wurde 45 Minuten bei Raumtemperatur gerührt und anschliessend in 1 l Äther eingetropft. Das ausgefällte Hydrobromid des Pentapeptides wurde mit Äther gewaschen; über H_2O und P_2O_5 getrocknet und in 100 ml Methanol gelöst. Die Lösung wurde über eine Säule von Dowex 2 (OH^- -Form) gegeben, das Eluat unter vermindertem Druck eingeeengt und der Rückstand in 100 ml DMF gelöst. Die Lösung wurde bei 10 mit 8,5 g Z-L-Leu-OPhNO₂ versetzt, die Mischung 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt und das geschützte Hexapeptid durch Zugabe von 1 l Äthylacetat ausgefällt, mit Äther und Äthylacetat gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 16,5 g; F. 183-185°; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -41,6^\circ$ (c = 0.5, in DMF).

- (b) Z-L-Leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid.

Von 5,0 g Z-L-Leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid wurde in der unter (a) beschriebenen Weise die Z-Schutzgruppe abgespalten und das erhaltene freie Amin wurde mit 1,85 g Z-L-Leu-OPhNO₂ in 50 ml DMF umgesetzt. Die Mischung wurde 3 Tage bei Raumtemperatur aufbewahrt, das geschützte Heptapeptid durch Zugabe von Äthylacetat ausgefällt, abfiltriert, mit Äthylacetat und Äther gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 4,5 g; F. 188-189°; $[\alpha]_{\text{D}}^{25} = -41,2^\circ$ (c = 1, in DMF).

409823/1105

(c) Tos-S-Benzyl-L-cysteinyl-O-benzyl-L-tyrosin-methylester.

Eine Lösung von 21,9 g Tos-S-Benzyl-L-cystein, 19,3 g O-Benzyl-L-tyrosin-methylester-hydrochlorid und 6,73 ml N-Methylmorpholin in 200 ml DMF wurde bei 0° mit 1,30 g Dicyclohexylcarbodiimid versetzt, 30 Minuten bei 0° und weitere 4 Stunden bei Raumtemperatur gerührt und 15 Stunden bei 4° aufbewahrt. Der Niederschlag wurde abfiltriert, das Filtrat unter vermindertem Druck eingeeengt, der Rückstand in Essigester gelöst und die Lösung je dreimal mit 1 N HCl, gesättigter NaCl-Lösung, gesättigter NaHCO₃-Lösung und gesättigter NaCl-Lösung gewaschen, getrocknet und unter vermindertem Druck eingeeengt. Der Rückstand wurde aus Aethanol/Hexan kristallisiert. Ausbeute: 25,7 g; F. 111-112°; $[\alpha]_D^{25} = +2,9^\circ$ (c = 1, in Methanol).

(d) Tos-S-Benzyl-L-cysteinyl-O-benzyl-L-tyrosin-hydrazid.

18 g Tos-S-Benzyl-L-cysteinyl-O-benzyl-L-tyrosin-methylester wurden unter Erwärmen in 150 ml Aethanol gelöst. Die Lösung wurde mit 7,5 ml Hydrazinhydrat versetzt, 18 Stunden bei 50° und 5 Stunden bei Raumtemperatur aufbewahrt. Das auskristallisierte Dipeptidhydrazid wurde abfiltriert, mit Aethanol und Aether gewaschen und getrocknet. Ausbeute: 15,5 g; F. 179-180°; $[\alpha]_D^{25} = +4,2^\circ$ (c = 1, in DMF).

(e) Tos-S-Benzyl-L-cysteinyl-O-benzyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid.

Eine Lösung von 0,95 g Tos-S-Benzyl-L-cysteinyl-O-benzyl-L-tyrosin-hydrazid in 15 ml DMF wurde bei -20° mit 4,5 ml 2 N HCl in THF und 0,8 ml Isoamylnitrit versetzt. Das Gemisch wurde 40 Minuten bei -20° gerührt und bei dieser

2357334

Temperatur nach Neutralisation mittels 1,01 ml N-Methylmorpholin mit einer Lösung von L-Leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid (erhalten durch Abspaltung der Z-Schutzgruppe von 1,83 g Z-L-Leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid in der unter (a) beschriebenen Weise) in 10 ml DMF versetzt. Das Gemisch wurde eine Stunde bei -20° gerührt und 15 Stunden bei 4° aufbewahrt. Dann wurde filtriert, das geschützte Nonapeptid durch Eintropfen des Filtrates in Wasser ausgefällt, abfiltriert, der Niederschlag mit siedendem Aethanol digeriert, abfiltriert und der Rückstand getrocknet. Ausbeute: 1,2 g; F. 228-230°; $[\alpha]_D^{25} = -24,8^\circ$ (c = 1, in DMF).

(f) [Leu³, Leu⁴]-Argininvasopressin-diacetat.

400 mg Tos-S-Benzyl-L-cysteinyl-O-benzyl-L-tyrosyll-L-leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid in 500 ml flüssigem Ammoniak wurden mit Natrium reduziert. Nach Entfernung des Ammoniaks wurde der Rückstand in 600 ml 0,2%iger Essigsäure gelöst und die Lösung mit NaOH auf pH 7,3 eingestellt. Daraufhin wurden 55 ml einer 0,01 M K₃[Fe(CN)₆]-Lösung zugegeben, wobei durch Zusatz von etwas NaOH der pH-Wert auf 6,8-7,4 gehalten wurde. Das Reaktionsgemisch wurde 15 Stunden bei 4° aufbewahrt und über eine Säule von Amberlite IR-45 (Cl⁻-Form) gegeben. Das Eluat wurde mit Essigsäure angesäuert und an Amberlite CG-50 (H⁺-Form) adsorbiert. Nach Waschen mit 500 ml 0,2%iger Essigsäure wurde mit einem Gemisch aus Pyridin/Eisessig/Wasser (30:4:66) eluiert und das Eluat unter intermediärer Aufnahme von Wasser zweimal lyophilisiert. Zur weiteren Reinigung wurde das Lyophilisat in 3 ml eines 0,5M Ammoniumacetat-Puffers (pH = 6,4) gelöst und nochmals an einer Säule aus Amberlite CG-50 (H⁺-Form) chromatographiert. Das

409823/1105

2357334

Eluat wurde mehrmals lyophilisiert. Ausbeute: 115 mg;
 $[\alpha]_D^{25} = -10,3^\circ$ ($c = 1$, in 1 N Essigsäure).

Papierelektrophorese:

Puffer aus 2 ml Eisessig und 20 ml Pyridin, aufgefüllt mit Wasser auf 1 l (pH = 6,0): $R_f(\text{Arginin}) = 0,64 \pm 0,05$;

Puffer aus 37 ml Ameisensäure und 25 ml Essigsäure, aufgefüllt mit Wasser auf 1 l (pH = 1,7) = $R_f(\text{Arginin}) = 0,47 \pm 0,05$.

Beispiel 2

(a) β -Benzylthiopropionyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid.

Eine Lösung von 0,373 g β -Benzylthiopropionyl-L-tyrosin-hydrazid [hergestellt nach M. Zaoral et al, Collection Czech. Chem. Commun. 32, 1250 (1967)] in 10 ml DMF wurde bei -20° mit 3 ml 2N HCl in THF und 0,4 ml Isocamylnitrit versetzt. Das Gemisch wurde 40 Minuten bei -20° gerührt und bei dieser Temperatur nach Neutralisation mittels 0,675 ml N-Methylmorpholin mit einer Lösung von L-Leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid (erhalten durch Abspaltung der Z-Schutzgruppe von 1,15 g Z-L-Leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid in der unter 1a beschriebenen Weise) in 10 ml DMF versetzt. Das Gemisch wurde eine Stunde bei -15° gerührt und 3 Tage bei 4° aufbewahrt. Dann wurde filtriert, das geschützte Peptid durch Eintropfen des Filtrates in ein Gemisch aus Wasser/Aethanol (2:1) ausgefällt, abfiltriert, erneut in DMF gelöst, durch Eintropfen dieser Lösung in Aethylacetat wieder ausgefällt, abfiltriert und getrocknet. Ausbeute: 0,8 g; F. 215-217°; $[\alpha]_D^{25} = -36,1^\circ$ ($c=1$, in DMF).

409823/1106

(b) Deamino¹-[Leu³, Leu⁴]-argininvasopressin-diacetat.

350 mg β -Benzylthiopropionyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid wurden analog zu der unter 1f beschriebenen Weise in das gewünschte Deamino¹-[Leu³, Leu⁴]-argininvasopressin-diacetat überführt. Ausbeute: 129 mg; $[\alpha]_D^{25} = -91,1^\circ$ (c = 1, in 95%iger Essigsäure)
Papiererelektrophorese:

Puffer aus 2 ml Eisessig und 20 ml Pyridin, aufgefüllt mit Wasser auf 1 l (pH = 6,0): $R_f(\text{Arginin}) = 0,42 \pm 0,05$;

Puffer aus 37 ml Ameisensäure und 25 ml Essigsäure, aufgefüllt mit Wasser auf 1 l (pH=1,7): $R_f(\text{Arginin}) = 0,24 \pm 0,05$.

Beispiel 3

(a) Z-Glycyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid.

Eine Lösung von 0,465 g Z-Glycyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosin-hydrazid [erhalten nach K. Jost et al., Collection Czech. Chem. Commun. 26, 2496 (1961)] in 10 ml DMF wurde bei -20° mit 2,4 ml 2N HCl in THF und 0,3 ml Isoamylnitrit versetzt. Das Gemisch wurde 40 Minuten bei -20° gerührt und bei dieser Temperatur nach Neutralisation mittels 0,54 ml N-Methylmorpholin mit einer Lösung von L-Leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid (erhalten durch Abspaltung der Z-Schutzgruppe von 0,92 g Z-L-Leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid in der unter 1a beschriebenen Weise) in 8 ml DMF versetzt. Das Gemisch wurde eine Stunde bei -15° gerührt und 2 Tage bei 4°

2357334

aufbewahrt. Dann wurde filtriert, das geschützte Dekapeptid durch Eintropfen des Filtrates in ein Gemisch aus Wasser/Aethanol (4:1) ausgefällt, abfiltriert, der Niederschlag erneut in DMF gelöst, durch Eintropfen dieser Lösung in Aethylacetat wieder ausgefällt, abfiltriert und getrocknet. Ausbeute: 0,65 g; F. 226-230°; $[\alpha]_D^{25} = -37,0^\circ$ (c=1, in DMF).

(b) Gly-[Leu³, Leu⁴]-argininvasopressin-diacetat.

350 mg Z-Glycyl-S-benzyl-L-cysteinyl-L-tyrosyl-L-leucyl-L-leucyl-L-asparaginyll-S-benzyl-L-cysteinyl-L-prolyl-N^G-tosyl-L-arginyl-glycinamid wurden analog zu der unter 1f beschriebenen Weise in das gewünschte Gly-[Leu³, Leu⁴]-argininvasopressin-diacetat überführt. Ausbeute: 76 mg; $[\alpha]_D^{25} = -70,2^\circ$ (c= 1, in 95%iger Essigsäure).

Papierelektrophorese:

Puffer aus 2 ml Eisessig und 20 ml Pyridin, aufgefüllt mit Wasser auf 1 l (pH = 6,0): $R_f(\text{Arginin}) = 0,74 \pm 0,05$;

Puffer aus 37 ml Ameisensäure und 25 ml Essigsäure, aufgefüllt mit Wasser auf 1 l (pH = 1,7): $R_f(\text{Arginin}) = 0,49 \pm 0,05$.

2357334

Beispiel 4

Es wurden in an sich bekannter Weise Sublingualtabletten folgender Zusammensetzung hergestellt:

a)	[Leu ³ ,Leu ⁴]-Argininvasopressin-diacetat	5,83 mg
	Milchzucker	66,17 mg
	Zucker pulv.	20,00 mg
	Polyvinylpyrrolidon	7,00 mg
	Magnesiumstearat	1,00 mg
		<hr/>
		100,00 mg
b)	[Leu ³ ,Leu ⁴]-Argininvasopressin-diacetat	11,66 mg
	Milchzucker	71,34 mg
	Mannit	60,00 mg
	Hydroxypropylmethylcellulose	5,00 mg
	Magnesiumstearat	2,00 mg
		<hr/>
		150,00 mg

Beispiel 5

Es wurde in an sich bekannter Weise eine Injektionslösung folgender Zusammensetzung hergestellt:

	<u>pro ml</u>
[Leu ³ ,Leu ⁴]-Argininvasopressin-diacetat	0,12 mg
NaCl	9,00 mg
HCl 0,1 N ad pH 3,5	q.s.
H ₂ O ad injekt.	ad 1,0 ml

409823/1105

2357334

Beispiel 6

Es wurde in an sich bekannter Weise ein Lyophilisat folgender Zusammensetzung hergestellt:

	<u>Gewichtsteile</u>
[Leu ³ , Leu ⁴]-Argininvasopressin- diacetat	11,60
L-Äpfelsäure	1,74
D-Mannit	150,00
	<hr/>
	163,34

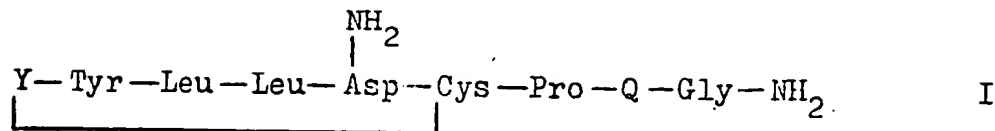
Um eine anwendungsfertige Injektionslösung zu erhalten werden 163,34 mg des Lyophilisates in 10 ml aqua dest. gelöst.

409823/1105

2357334

Patentansprüche

① Verfahren zur Herstellung von Polypeptiden der Formel



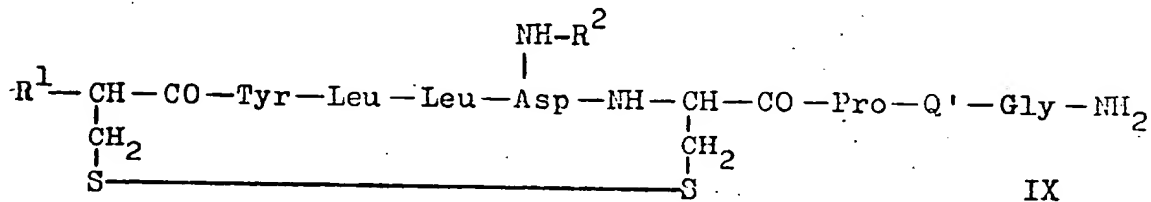
worin Q den Rest des Arginins oder Lysins und

Y den Rest des Cysteins, der β -Mercaptopropion-
säure oder Gly-Cys- darstellen und alle
Aminosäuren mit einem Asymmetriezentrum

L-Konfiguration aufweisen,

und deren pharmazeutisch anwendbaren, nicht-toxischen Säure-
additionssalzen, dadurch gekennzeichnet, dass man

a) von einem Peptid der Formel



worin R^1 Wasserstoff oder einen Rest $\text{R}^{11}-\text{NH}-$,

R^{11} Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe
oder den gegebenenfalls geschützten
Glycylrest,

R^2 Wasserstoff oder eine Amidschutzgruppe,

Q' einen Rest der Formel

$-\text{NH}-\text{CH}[-(\text{CH}_2)_3-\text{NH}-\text{C}(=\text{NH})-\text{NHR}^3]-\text{CO}-$ oder

$-\text{NH}-\text{CH}[-(\text{CH}_2)_4-\text{NH}-\text{R}^4]-\text{CO}-$,

R^3 Wasserstoff oder eine den Guanidinrest
schützende Gruppe und

R^4 Wasserstoff oder eine die ϵ -Aminogruppe des
Lysins schützende Gruppe bedeuten, aber

409823/1105

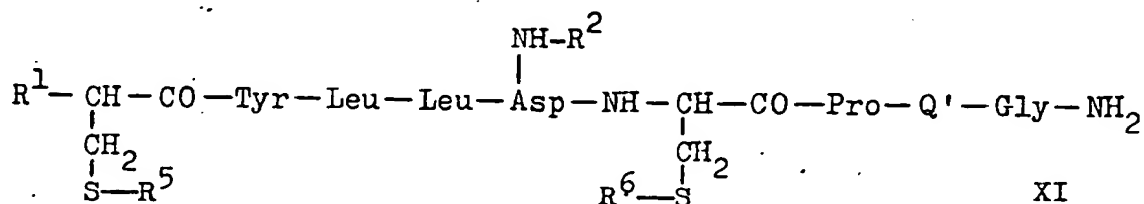
die Schutzgruppe(n) abspaltet und das freie Peptid gegebenenfalls durch Umsetzung mit einer organischen oder anorganischen Säure in ein pharmazeutisch anwendbares, nicht-toxisches Säureadditionssalz überführt, oder

$$\begin{array}{ccccccc} & & & \text{NH}_2 & & & \\ & & & | & & & \\ R^7 - CH - CO - Tyr - Leu - Leu - Asp - NH - CH - CO - Pro - Q - Gly - NH_2 \\ | & & & & & & | \\ CH_2 & & & & & & CH_2 \\ | & & & & & & | \\ S - R^5 & & & & & & R^6 - S \end{array}$$

R⁵ und R⁶ jeweils Wasserstoff oder Sulfhydrylschutzgruppen darstellen und

oxydiert, unter gleichzeitiger oder vorgängiger Abspaltung gegebenenfalls vorhandener Schutzgruppen und das Reaktionsprodukt gewünschtenfalls durch Umsetzung mit einer organischen oder anorganischen Säure in ein pharmazeutisch anwendbares, nicht-toxisches Säureadditionssalz überführt, oder

c) ein Peptid der Formel



worin R^1 Wasserstoff oder R^{11} -NH-;
 R^{11} Wasserstoff, eine Aminoschutzgruppe oder
den ggf. geschützten Glycylrest,
 R^2 Wasserstoff oder eine Amidschutzgruppe;
 Q' einen Rest der Formel

$$-NH-CH[-(CH_2)_3-NH-C(=NH)-NHR^3]-CO- \quad \text{oder}$$

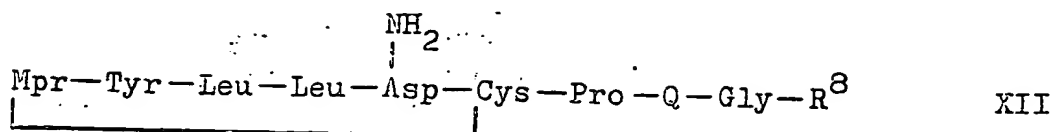
$$-NH-CH[-(CH_2)_4-NH-R^4]-CO-,$$

 R^3 Wasserstoff oder eine den Guanidinrest
schützende Gruppe,
 R^4 Wasserstoff oder eine die ϵ -Aminogruppe
des Lysins schützende Gruppe und
 R^5 und R^6 jeweils Wasserstoff oder Sulfhydryl-
schutzgruppen darstellen, aber mindestens
einer der Reste R^1 , R^2 und R^3 bzw. R^4
eine Schutzgruppe darstellt bzw. enthält
und alle Aminosäuren mit einem Asymmetrie-
zentrum L-Konfiguration aufweisen.

unter gleichzeitiger Abspaltung der Schutzgruppe(n) oxydiert und das Reaktionsprodukt gewünschtenfalls durch Umsetzung mit einer organischen oder anorganischen Säure in ein pharmazeutisch anwendbares, nicht-toxisches Säureadditionssalz überführt, oder

d) eine Verbindung der Formel

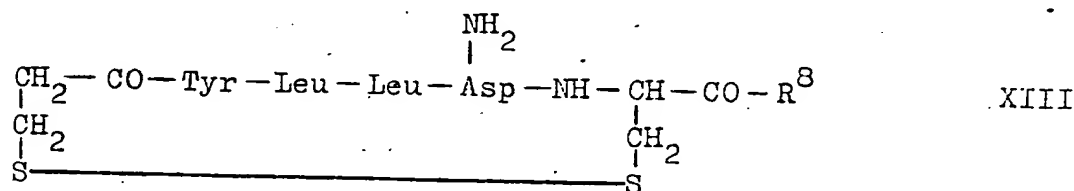
2357334



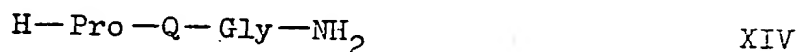
worin Q die oben angegebenen Bedeutungen hat,
 R^8 Hydroxy oder ein die Carboxylgruppe
 aktivierender Rest ist und

Mpr den Rest der β -Mercaptopropionsäure bedeutet,
 amidiert oder

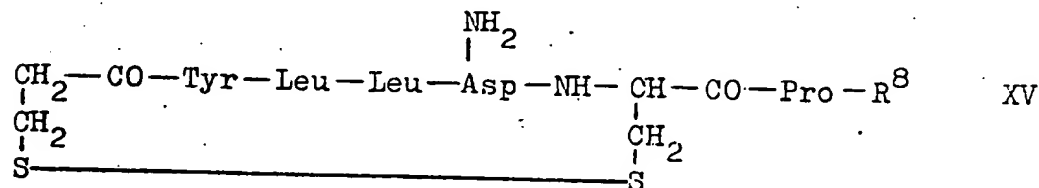
e) ein Hexapeptid der Formel



mit einem Tripeptid der Formel



bzw. ein Heptapeptid der Formel

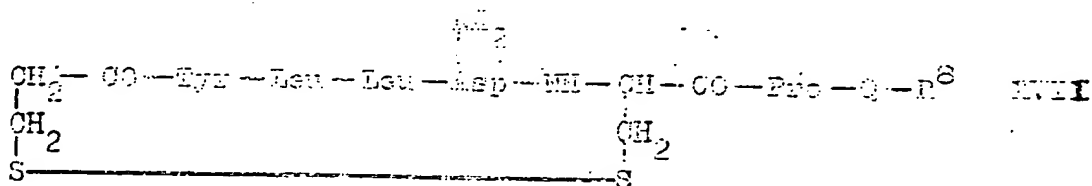


mit einem Dipeptid der Formel



bzw. ein Octapeptid der Formel

409823/1105



mit Glycinamid umgesetzt und das erhaltene Nonapeptid gegebenenfalls in ein pharmazeutisch anwendbares, nicht-toxisches Säureadditionssalz überführt, wobei in den Formeln XIV und XVI Q die oben angegebenen Bedeutungen hat, R⁸ Hydroxy oder eine die Carboxylgruppe aktivierende Gruppe darstellt, und alle Aminosäuren mit einem Asymmetriezentrum L-Konfiguration aufweisen.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass [Leu³, Leu⁴]-Argininvasopressin oder ein Salz davon hergestellt wird.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass [Leu³, Leu⁴]-Lysinvasopressin oder ein Salz davon hergestellt wird.

4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Deamino¹-[Leu³, Leu⁴]-argininvasopressin oder ein Salz davon hergestellt wird.

5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Deamino¹-[Leu³, Leu⁴]-lysinvasopressin oder ein Salz davon hergestellt wird.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Gly-[Leu³, Leu⁴]-argininvasopressin oder ein Salz davon hergestellt wird.

.409823/1105

2357334

7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass Gly-[Leu³, Leu⁴]-lysinvasopressin oder ein Salz davon hergestellt wird.

2357334

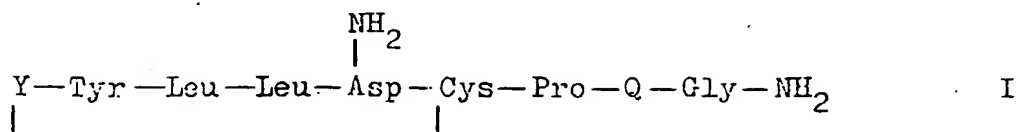
8. Verfahren zur Herstellung von pharmazeutischen Präparaten, dadurch gekennzeichnet, dass man eine oder mehrere Verbindungen der Formel I gemäss Anspruch 1 oder eines oder mehrere ihrer nicht-toxischen Säureadditionssalze mit zur therapeutischen Verabreichung geeigneten, nicht-toxischen, inerten, an sich in solchen Präparaten üblichen festen oder flüssigen Trägern vermischt.

9. Pharmazeutische Präparate, gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer oder mehreren Verbindungen der Formel I gemäss Anspruch 1 oder eines oder mehrerer ihrer nicht-toxischen Säureadditionssalze.

409823/1105

2357334

10. Ein Polypeptid der Formel



worin Q den Rest des Arginins oder Lysins und
Y den Rest des Cysteins, der β -Mercapto-
propionsäure oder Gly-Cys- darstellen
und alle Aminosäuren mit einem Asymmetric-
zentrum L-Konfiguration aufweisen,
und dessen pharmazeutisch anwendbare, nicht-toxische Säure-
additionssalze.

11. [Leu³, Leu⁴]-Argininvasopressin und dessen pharma-
zeutisch anwendbare, nicht-toxische Säureadditionssalze.

12. [Leu³, Leu⁴]-Lysinvasopressin und dessen pharma-
zeutisch anwendbare, nicht-toxische Säureadditionssalze.

13. Deamino¹-[Leu³, Leu⁴]-argininvasopressin und dessen
pharmazeutisch anwendbare, nicht-toxische Säureadditionssalze.

14. Deamino¹-[Leu³, Leu⁴]-lysinvasopressin und dessen
pharmazeutisch anwendbare, nicht-toxische Säureadditionssalze.

15. Gly-[Leu³, Leu⁴]-argininvasopressin und dessen
pharmazeutisch anwendbare, nicht-toxische Säureadditionssalze.

16. Gly-[Leu³, Leu⁴]-lysinvasopressin und dessen pharma-
zeutisch anwendbare, nicht-toxische Säureadditionssalze.